

Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений на основе метода Култера в растворах для парентерального введения

А. А. Воропаев*, О. В. Фадейкина, Д. С. Давыдов, А. А. Мовсесянц

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Для определения невидимых механических включений (размером менее 100 мкм) в лекарственных формах для парентерального применения Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания предусматривает применение метода Култера в дополнение к счетно-фотометрическому методу и методу микроскопии. Использование предлагаемой апертурной трубки с отверстием диаметром 100 мкм не позволяет оценить весь диапазон размеров невидимых механических включений. Таким образом, актуальны исследования по подбору оптимальных параметров методики определения невидимых механических включений на основе метода Култера. **Цель работы:** модификация методики на основе метода Култера с использованием апертуры диаметром 200 мкм и проведение валидационных исследований модифицированной методики. **Материалы и методы:** исследования проводили с использованием анализатора размеров частиц Multisizer 4e, использовали суспензии стандартных латексных частиц с заданными размерами 10, 20, 43 мкм и стандартный образец счетной концентрации с содержанием $0,998 \times 10^6$ частиц/мл. В ходе валидации модифицированной методики оценивали следующие валидационные характеристики: правильность, повторяемость (сходимость), линейность. **Результаты:** проведенное исследование подтвердило возможность использования модифицированной методики с апертурой диаметром 200 мкм, основанной на методе Култера. Установлены валидационные характеристики модифицированной методики: правильность в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 5,3% (по отклонению от среднего значения); в сравнении со счетно-фотометрическим методом — 4,2%. Повторяемость (сходимость) результатов составила: 1% (по относительно стандартному отклонению) — при концентрации ≈ 10000 частиц в 1 мл и 7,6% — при концентрации ≈ 300 частиц в 1 мл. Показана линейность: коэффициент корреляции линейной зависимости более 0,99. **Выводы:** установлено соответствие критериям приемлемости по исследованным валидационным характеристикам модифицированной методики. Применение модифицированной методики позволит оценить весь требуемый диапазон размеров невидимых механических включений при оценке качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Ключевые слова: метод Култера; метод электрочувствительных зон; невидимые механические включения; растворы для парентерального введения

Для цитирования: Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Давыдов ДС, Мовсесянц АА. Модификация и валидация методики оценки невидимых механических включений на основе метода Култера в растворах для парентерального введения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(2):108–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-108-115>

* **Контактное лицо:** Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Modification and validation of the test procedure for determination of sub-visible particulate matter in parenteral solutions, using the Coulter method

A. A. Voropaev*, O. V. Fadeikina, D. S. Davydov, A. A. Movsesyants

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th edition provides for determination of sub-visible particles (less than 100 μm in size) in parenteral dosage forms using the Coulter method, in addition to the light obscuration particle count test and microscopy. However, the proposed 100 μm aperture tube does not enable assessment of the whole range of sub-visible particle sizes. Therefore, research is needed to find optimal test conditions for determination of sub-visible particulate matter by the Coulter method. **The aim of the study:** modification of the Coulter-based procedure using a 200 μm aperture tube, and performance of validation studies. **Materials and methods:** Multisizer 4e Coulter counter, suspensions of reference latex particles (10 μm , 20 μm , and 43 μm), and a particulate count reference standard containing 0.998×10^6 particles/mL were used in the study. The following parameters were assessed during validation: accuracy, repeatability, linearity. **Results:** the study confirmed the feasibility of using the modified Coulter-based procedure with a 200 μm aperture tube. The following values were obtained during validation of the modified test procedure: accuracy was 5.3% (deviation from the mean value) as compared to the particulate count reference standard, and 4.2% as compared to the light obscuration method. Repeatability was 1% (relative standard deviation) for the particle concentration of approximately 10000 per 1 mL, and 7.6% for the particle concentration of approximately 300 per 1 mL. The study demonstrated the linearity of the procedure, the linear correlation coefficient was more than 0.99. **Conclusions:** the studied validation parameters of the modified test procedure were shown to comply with the acceptance criteria. The modified test procedure will enable assessment of the whole range of sub-visible particle sizes when testing parenteral solutions for particulate contamination: sub-visible particles.

Key words: Coulter method; electrical sensing zone method; sub-visible particulate matter; parenteral solutions

For citation: Voropaev AA, Fadeikina OV, Davydov DS, Movsesyants AA. Modification and validation of the test procedure for determination of sub-visible particulate matter in parenteral solutions, using the Coulter method. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(2):108–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-108-115>

***Corresponding author:** Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Одним из методов определения невидимых механических включений в лекарственных формах для парентерального применения, предусмотренных Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания¹, является метод Култера, или метод электрочувствительных зон, с использованием анализатора размеров частиц. В основе метода лежит измерение электрического тока при прохождении частицы через калиброванное отверстие, называемое апертурой, находящееся в апертурной трубке. Имеется широкий выбор апертур диаметром от 10 до 2000 мкм. Для оценки невидимых механических включений (10–100 мкм) возможно использование трубок с апертурами следующих диаметров: 100, 200, 280 и 400 мкм. Диаметр данного отверстия определяет возможный диапазон размеров измеряемых частиц, который обычно составляет 2–60% от размера апертуры² (табл. 1).

Под невидимыми частицами принято понимать частицы размером от 10 до 100 мкм. Таким образом, для проведения испытаний могут подойти апертурные трубки с диаметром апертуры 100, 200 мкм. Апертурные трубки с отверстием диаметром более 280 мкм используют только для определения размеров частиц, без подсчета количества частиц в определенном объеме.

В Государственной фармакопее Российской Федерации³ при описании метода электрочувствительных зон указано, что проводить испытания необходимо с использованием трубки с апертурой диаметром 100 мкм. Минусом использования данной трубки является диапазон размеров измеряемых частиц, который составляет от 2 до 60 мкм, позволяющий выявить не более 56% частиц, входящих в диапазон размеров невидимых механических включений (до 100 мкм). Использование трубки с апертурой диаметром 200 мкм имеет следующие преимущества.

1. Диапазон измерений перекрывает весь контролируемый диапазон размеров невидимых механических включений.

2. Электрическое сопротивление в апертуре прямо пропорционально зависит от ее диаметра, поэтому использование трубки с большим диаметром апертуры позволяет провести испытание большего количества материалов с различной электропроводностью. Электропроводность испытуемых образцов напрямую влияет на точность испытаний [1, 2]. Одним из способов решения проблемы электропроводности является модификация методики и подбор растворителя [3]. Однако до-

полнительные разведения препарата электролитом, отличным от входящего в комплект с препаратом, например использование 9% раствора натрия хлорида вместо воды для инъекций, могут вызывать искажения результата [4]. Использование трубки с апертурой диаметром 200 мкм в некоторых случаях может быть более простым решением данной проблемы.

3. Уменьшается время одного испытания, так как скорость потока исследуемого раствора выше в трубке с апертурой большего диаметра. Скорость анализа аналитической пробы объемом 1 мл при использовании трубки с апертурой диаметром 100 мкм составляет 25 с, тогда как при использовании трубки с апертурой диаметром 200 мкм — 6 с.

4. Уменьшается вероятность закупорки апертуры частицами максимального размера, не имеющими сферической формы⁴.

Цель работы: модификация методики на основе метода Култера с использованием апертуры диаметром 200 мкм и проведение валидационных исследований модифицированной методики.

Материалы и методы

Материалы:

- изотонический раствор Изотон II (Beckman Coulter Life Sciences, США);
- вода очищенная, полученная на установке Milli-Q Integral 10 (Millipore Corp., Франция);
- суспензии стандартных латексных частиц NIST (National Institute of Standards and Technology) Coulter® CC Size Standard с заданными размерами 10, 20, 43 мкм (серия 477062K; Beckman Coulter Life Sciences, США);
- стандартный образец счетной концентрации — суспензия латексных частиц для проверки концентрации (серия 7497044F; Beckman Coulter Life Sciences, США, концентрация $0,998 \times 10^6$ частиц/мл).

Методы

Метод электрочувствительных зон. Работу выполняли на анализаторе размеров частиц Multisizer 4e (Beckman Coulter Life Sciences, США). Объем аналитической пробы 1 мл, количество измерений 10, подсчет частиц размером более 5 мкм.

Таблица 1. Доступные апертурные трубки для Multisizer 4e и диапазон размеров измеряемых частиц
Table 1. Available aperture tubes for Multisizer 4e, and particle size range

Трубка с апертурой диаметром, мкм Tube aperture diameter, μm	Диапазон размеров измеряемых частиц, мкм Measured particle size range, μm
50	1–30
100	2–60
200	4–120
280	5,6–168
400	8–240

¹ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² Coulter principle short course. Beckman Coulter Inc.; 2014.

³ Общая фармакопейная статья 1.4.2.0006.15 Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ISO 13319 Determination of particle size distributions — Electrical sensing zone method, 2007.

Испытуемые образцы помещали в вialу Accuvette ST (Beckman Coulter Life Sciences, США).

Метод счетно-фотометрический. Испытания проводили на счетчике частиц в жидкости HIAC 9703+ (Beckman Coulter Life Sciences, США). Объем аналитической пробы 1 мл, количество измерений 10, подсчет частиц размером более 5 мкм сенсором HRLD150.

Подготовка проб для оценки влияния теплового шума в образцах с низкой электропроводностью. Изотон II фильтровали через шприцевой фильтр Minisart с диаметром пор 0,2 мкм производства Sartorius Stedim biotech, Франция. Растворы с различной концентрацией хлорида натрия готовили путем смешивания воды очищенной с профильтрованным Изотоном II:

- раствор А: 25% Изотон II, сопротивление 45 кОм;
- раствор Б: 1% Изотон II, сопротивление 460 кОм;
- раствор В: 0,5% Изотон II, сопротивление 812 кОм.

Подготовка суспензии стандартного образца счетной концентрации для проведения исследований. Тщательно перемешивали суспензию стандартных латексных частиц в течение 15 с. Ожидали 10 мин для оседания пены. После этого переносили 200 мкл суспензии в вialу Accuvette ST, добавляли 20 мл Изотона II и перемешивали без образования пузырьков. Концентрация частиц в подготовленной суспензии согласно паспорту составляет $0,998 \times 10^3$ частиц/мл с точностью 10%.

Приготовление серии разведений суспензий стандартных латексных частиц для оценки линейности. В лабораторный стакан с 800 мл электролита добавляли суспензию стандартных латексных частиц при постоянном перемешивании на магнитной мешалке счетчика HIAC 9703+. При этом измеряли количество частиц в 1 мл, доводя концентрацию частиц до верхнего предела измерения счетчика. После этого суспензию перемешивали в течение 10 мин и переносили 400 мл в другой стакан, содержащий 400 мл электролита, для получения двукратного разведения. Снова перемешивали в течение 10 мин и проводили следующее двукратное разведение. Таким образом готовили четыре разведения исходной суспензии.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение (SD), относительное стандартное отклонение (RSD), коэффициент корреляции (r) с помощью программы Excel [5].

Валидация. Валидацию методики, основанной на методе Култера, с использованием трубки с апертурой диаметром 200 мкм проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик⁵ по характеристикам: правильность, повторяемость, линейность. Оценку правильности проводили с использованием двух вариантов эксперимента: 1) анализ с использованием модельных смесей с известной концентрацией частиц; 2) сравнение результатов с данными, полученными

с использованием счетно-фотометрического метода, правильность которого была установлена ранее.

Результаты и обсуждение

Оценка влияния электропроводности образца

Для реализации принципа электрочувствительных зон в анализаторе размеров частиц Multisizer 4e используется стеклянная трубка, в стенке которой имеется микроотверстие (апертура). Перед проведением испытания в анализаторе частиц измеряют электрическое сопротивление исследуемого образца в апертуре. Данное сопротивление зависит от электропроводности исследуемого образца и размера апертуры. Электрическое сопротивление в растворах определяется по формуле (1):

$$R = \rho \times \left(\frac{l}{A} \right), \quad (1)$$

где R — сопротивление, ρ — удельное сопротивление раствора, l — расстояние между электродами, A — площадь поперечного сечения образца, в данном случае — это площадь апертуры. Исходя из этой формулы, сопротивление образца в апертуре прямо пропорционально зависит от диаметра апертуры. Максимальное сопротивление в апертуре ($R_{кр}$), допускаемое производителем, составляет 100 кОм. Для проведения исследований рекомендуется использовать образцы, сопротивление которых находится в диапазоне 5–40 кОм⁶.

Электрическое сопротивление уменьшается обратно пропорционально увеличению диаметра апертуры, что подтверждается экспериментальными данными измерения сопротивления в апертуре Изотона II и воды очищенной, представленными в таблице 2.

Как следует из приведенных в таблице 2 данных, для апертуры меньшего диаметра (100 мкм) сопротивление тока одного и того же образца выше в 2 раза, чем для апертуры большего диаметра (200 мкм).

Таким образом, для оценки невидимых механических включений в препаратах с низкой электропроводностью можно рекомендовать использовать трубки с апертурой большего диаметра (200 мкм), так как сопротивление исследуемого образца при использовании таких апертур будет меньше.

От размера апертуры зависит уровень так называемого теплового шума. Тепловой (или джонсоновский) шум — равновесный шум, обусловленный тепловым движением носителей заряда в проводнике, в результате чего на концах проводника возникает флуктуирующая разность потенциалов [6]. Тепловой шум проявляется чаще всего увеличением количества малых частиц, которое не согласуется с ожидаемым распределением частиц. Хотя эти частицы не принимаются в учет при оценке количества частиц нормируемого диапазона, подсчет малых частиц влияет на общий ход анализа. С уменьшением

Таблица 2. Электрическое сопротивление образцов при использовании трубки с апертурой диаметром 100 и 200 мкм
Table 2. Electrical resistance of samples when using 100 and 200 µm aperture tubes

Образец Sample	Электрическое сопротивление образца в трубке с апертурой 100 мкм, кОм Electrical resistance of the sample in a 100 µm aperture tube, kΩ	Электрическое сопротивление образца в трубке с апертурой 200 мкм, кОм Electrical resistance of the sample in a 200 µm aperture tube, kΩ
Изотон II Isotone II	14	7
Вода очищенная Purified water	1900	840

⁵ Общая фармакопейная статья 1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁶ Coulter principle short course. Beckman Coulter Inc.; 2014.

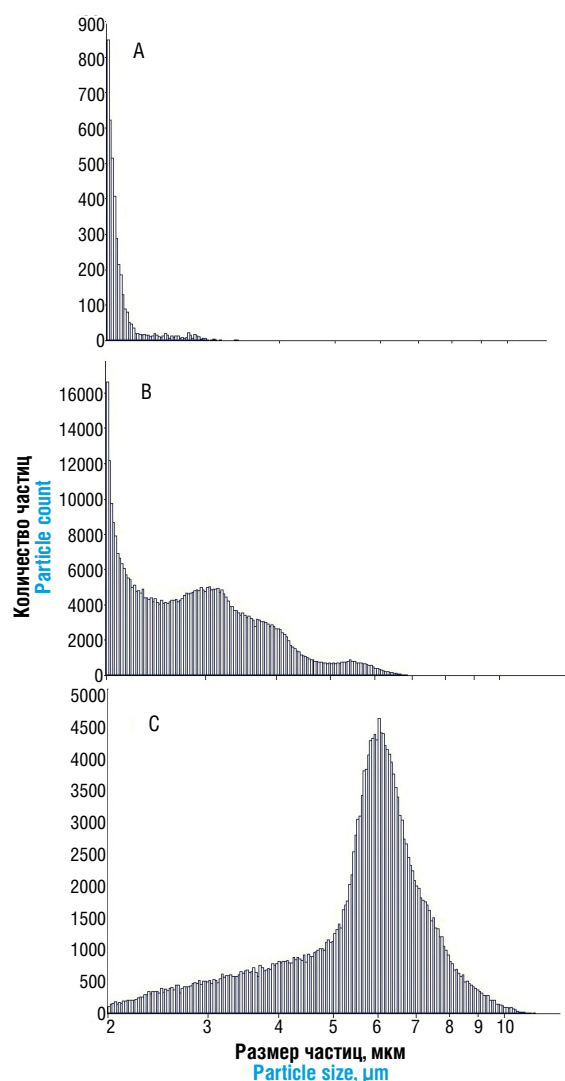


Рис. 1. Тепловой шум в образцах с различной концентраций натрия хлорида (апертура 200 мкм): А — 45 кОм, 25% Изотон II; В — 460 кОм, 1% Изотон II; С — 812 кОм, 0,5% Изотон II.

Fig. 1. Thermal noise in samples with different concentrations of sodium chloride (200 μm aperture): А—45 k Ω , 25% Isotone II; В—460 k Ω , 1% Isotone II; С—812 k Ω , 0.5% Isotone II.

электропроводности раствора максимум теплового шума будет смещаться к большему значению. На рисунке 1 представлены результаты измерений количества частиц в растворах, не содержащих частицы, но с различным электрическим сопротивлением (45, 460, 812 кОм). Низкая электропроводность образцов создает тепловой шум, который определяется как частицы. Тепловой шум, способный повлиять на результаты подсчета частиц размером 10–100 мкм, появляется при электрическом сопротивлении в апертуре более 800 кОм (рис. 1С). Хотя при достаточной электропроводности образца (рис. 1А и 1В) сигналы от шума не могут повлиять на результаты подсчета количества частиц в диапазоне 10–100 мкм, данные сигналы не позволяют провести анализ, так как исчерпывается лимит на количество импульсов (500 тысяч), которые могут быть проанализированы прибором в ходе одного измерения⁷.

⁷ Multisizer 4e User's Manual. Beckman Coulter Inc.; 2010.

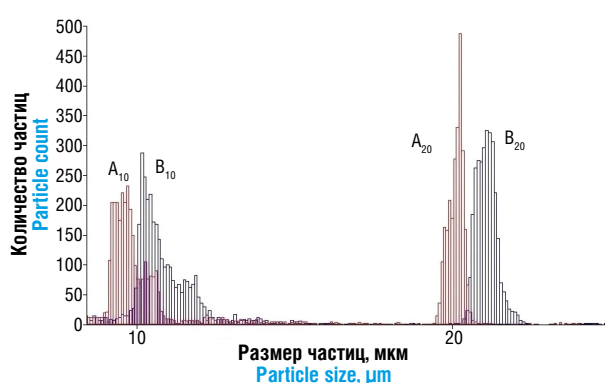


Рис. 2. Результат анализа суспензии стандартных латексных частиц 10 и 20 мкм: А₁₀, А₂₀ — количество частиц размерами 10 и 20 мкм, измерение проводили при силе тока 800 мА, усиление 4; В₁₀, В₂₀ — количество частиц размерами 10 и 20 мкм, измерение проводили при силе тока 1600 мА, усиление 2.

Fig. 2. Results of analysis of a suspension of 10 μm and 20 μm reference latex particles: А₁₀, А₂₀—the number of 10 μm and 20 μm particles measured at a current of 800 mA, gain 4; В₁₀, В₂₀—the number of 10 and 20 μm particles measured at a current of 1600 mA, gain 2.

Другим фактором, влияющим на проведение анализа, является концентрация частиц в образце: если концентрация частиц резко изменяется, то прибор это воспринимает как блокировку апертуры. В этом случае прибор прерывает ход измерения и сообщает об ошибке. Данный эффект проявляется как изменение количества частиц (особенно в нижнем пределе измерения), а также как резкое изменение концентрации частиц и (или) изменение скорости потока жидкости.

Таким образом тепловой шум из-за высокого электрического сопротивления блокирует ход анализа. Избежать влияния теплового шума можно, установив нижний порог определения частиц выше диапазона размеров малых частиц, равных 10 мкм. При проведении анализа образцов с низкой электропроводностью важно правильно выбрать параметры величины электрического импульса (силу тока, Current Aperture) и усиления (Gain), которые будут применяться во время испытания. При неправильном выборе этих параметров возможно получение неверных результатов по размеру частиц. На рисунке 2 представлены результаты двух анализов при разных значениях силы тока и усиления одного и того же образца с удельной электропроводностью 7 мСм/см и удельным сопротивлением 250 кОм/см. К образцу были добавлены стандартные образцы латексных частиц размером 10 и 20 мкм.

При анализе со стандартными параметрами, автоматически устанавливаемыми анализатором (сила тока 1600 мА, усиление 2, апертура диаметром 100 мкм), латексные частицы определяются со средним размером (мода) В₁₀ = 9,8 мкм и В₂₀ = 21,06 мкм, превышающим указанный в паспорте суспензий стандартных латексных частиц (мода): А₁₀ = 9,699 мкм и А₂₀ = 20,83 мкм соответственно.

Таким образом, важно выполнять предварительные настройки силы тока и усиления, используя раствор с той же электрической проводимостью, что и исследуемые образцы. При исследовании образцов с низкой электропроводностью в настройках прибора силу тока необходимо уменьшить, а усиление — увеличить.

Если испытуемые образцы имеют электропроводность ниже предельного значения, то возможно разведение образцов раствором натрия хлорида. При разведении необходимо учитывать следующие рекомендации.

1. Разведение раствором натрия хлорида не должно приводить к изменению физических свойств образца: выпадению осадка, растворению/разрушению конгломератов частиц.

2. Разведение должно быть таким, чтобы электрическое сопротивление образца в апертуре находилось в диапазоне 5–40 кОм.

3. Добавляемый к испытуемому образцу раствор электролита должен быть отфильтрован от частиц.

4. При расчете результатов необходимо учитывать коэффициент разведения и рассчитывать количество частиц на первоначальный объем.

5. Разведение должно быть минимальным и не влиять на статистическую точность анализа.

По результатам проведенных исследований мы предлагаем основанную на методе Култера методику оценки качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Описание модифицированной методики

Подготовка прибора. Определение проводят с использованием апертуры диаметром 200 мкм. В настройках программного обеспечения выбирают нижний предел диапазона размеров частиц, подлежащих анализу, равный 10 мкм, а верхний предел равный 100 мкм. Перед испытанием необходимо измерить сопротивление апертуры и выбрать подходящие силу тока и усиление электрического импульса.

Измерения проводят, устанавливая в программном обеспечении анализатора Multisizer 4e пороговую величину размеров измеряемых частиц, равную 10 мкм.

Подготовка образца для испытаний. Не менее 20 мл образца тщательно перемешивают, избегая загрязнения извне и образования пузырьков воздуха.

Измерение. Объем одной аналитической пробы (измеряемый объем) равен 1 мл. Проводят измерение трех аналитических проб. Принимают в расчет среднее по результатам измерений трех аналитических проб в образце.

Валидационные исследования при выполнении испытаний по показателю «Невидимые механические включения» с использованием модифицированной методики

В ходе данных исследований оценивали следующие валидационные характеристики: правильность, повторяемость и линейность. В руководстве по валидации рекомендовано планировать эксперимент так, чтобы соответствующие валидационные характеристики изучались одновременно, обеспечивая правильное и полное понимание возможностей аналитической методики⁸. Оценку валидационных характеристик модифицированной методики проводили тремя способами.

Способ 1. Использование суспензий стандартного образца счетной концентрации. Результаты должны совпадать с паспортными характеристиками стандартных образцов счетной концентрации. Относительная погрешность измерений между отдельными аналитическими пробами, не должна превышать $\pm 20\%$ для методики на основе метода Култера⁹.

Способ 2. Использование суспензий стандартных латексных частиц с размерами частиц, входящими в исследуемый

диапазон 10–100 мкм. В отличие от стандартного образца счетной концентрации количество частиц в суспензиях стандартных латексных частиц неизвестно. Поэтому вначале готовят суспензию, содержащую близкую к максимальной концентрации частиц, которую способен определить прибор. Из этой суспензии готовят серию двукратных разведений: не менее чем 5 проб с различной концентрацией. Анализируют каждое разведение и вычисляют среднее значение. Экспериментальные данные обрабатывают методом наименьших квадратов с расчетом коэффициента корреляции r . Критерий приемлемости $r \geq 0,99$. Относительная погрешность между отдельными измерениями не должна превышать $\pm 20\%$.

Способ 3. Оценка правильности в сравнении с методикой, правильность которой ранее подтверждена. Используют суспензии стандартных латексных частиц. Часть образца анализируют с помощью валидируемой методики, другую часть анализируют с помощью метода, правильность которого подтверждена ранее. Результаты оценки количества частиц разными методами не должны отличаться более чем на 30% ¹⁰.

При валидации совмещали все три способа для полного раскрытия возможностей методики в рамках экспериментов со стандартным образцом счетной концентрации и серии разведений суспензий стандартных латексных частиц.

Эксперименты со стандартным образцом счетной концентрации. Проводили по десять измерений методикой на основе метода Култера с использованием трубок с апертурой диаметром 100, 200 мкм и счетно-фотометрическим методом. Определяли правильность как отклонение среднего результата подсчета количества частиц от истинного значения (выраженное в процентах). За истинное значение принимали концентрацию частиц согласно паспорту стандартного образца. Дополнительно рассчитывали правильность, принимая за истинное значение результаты подсчета количества частиц, полученные при использовании счетно-фотометрического метода. Критерий приемлемости: отклонение не должно превышать относительную погрешность методики (20%) или погрешность результатов подсчета в стандартном образце счетной концентрации (10%).

Повторяемость результатов измерений определяли как разброс результатов относительно величины среднего результата, рассчитывая относительное стандартное отклонение (RSD). Критерий приемлемости: относительное стандартное отклонение, характеризующее разброс результатов, не должен превышать 20% .

Эксперименты с серией разведений суспензий стандартных латексных частиц. Проводили по десять измерений методикой на основе метода Култера с использованием трубок с апертурой диаметром 100 и 200 мкм и счетно-фотометрическим методом для каждого разведения суспензий стандартных латексных частиц. Рассчитывали правильность, принимая за истинное значение результаты подсчета количества частиц, полученные при использовании счетно-фотометрического метода. Критерий приемлемости: разброс значений не должен превышать 20% . Повторяемость результатов измерений определяли как разброс результатов относительно величины среднего результата, рассчитывая относительное стандартное отклонение (RSD). Критерий приемлемости: разброс значений не должен превышать 20% . Линейность определяли наличием зависимости результата измерений от концентрации: коэффициент корреляции r линейной за-

⁸ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 «Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств».

⁹ Методика поверки МП 242-1382-2013 «Анализаторы размеров частиц Multisizer. Методика поверки». ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 2013.

¹⁰ Методика поверки МП 242-2221-2018 «Счетчики частиц в жидкости ИАС 9703». ГЦИ СИ ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 2018.

Таблица 3. Результаты оценки правильности и повторяемости (*RSD*) измерений в эксперименте с использованием стандартного образца счетной концентрации

Table 3. The results of accuracy and repeatability (*RSD*) assessment using the particulate count reference standard

Характеристика Validation parameter	Методика на основе метода Култера, анализатор Multisizer 4е, трубка с апертурой диаметром, мкм Coulter-based procedure, Multisizer 4e counter, tube aperture diameter, μm		Методика на основе счетно-фотометрического метода, счетчик HIAC 9703+ Light obscuration method, HIAC 9703+ Particle Counter	Паспортные данные стандартного образца счетной концентрации Data presented in the particulate count reference standard certificate
	100	200		
Среднее количество частиц в 1 мл \pm SD Average number of particles per mL \pm SD	10506 \pm 124	9454 \pm 70	9870 \pm 93	9980 \pm 998
Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %	1,18	0,74	0,95	10
Правильность, отклонение от среднего количества частиц в стандартном образце счетной концентрации, % Accuracy, deviation from the mean number of particles in the particulate count reference standard, %	5,3	5,3	1,1	—
Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	6,4	4,2	—	—

Примечание. SD — стандартное отклонение; RSD, % — относительное стандартное отклонение. «—» — отсутствие данных.

Note. SD—standard deviation; RSD, %—relative standard deviation. — no data available.

Таблица 4. Оценка правильности и повторяемости (*RSD*) по результатам измерений серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами 10, 20 и 43 мкм

Table 4. The results of accuracy and repeatability (*RSD*) assessment using a series of dilutions of suspensions of reference latex particles (10, 20, and 43 μm)

Размер частиц, мкм Particle size, μm	Концентрация частиц в 1 мл Particle concentration in 1 mL	Значение показателей, рассчитанных по результатам измерений с использованием трубки с апертурой диаметром, мкм Measurement results obtained using a tube aperture diameter, μm			
		100 100		200 200	
		Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %	Правильность, отклонение от среднего количества частиц, определенного счетно-фотометрическим методом, % Accuracy, deviation from the mean number of particles determined by the light obscuration method, %	Повторяемость (<i>RSD</i>), % Repeatability (<i>RSD</i>), %
10	\approx 10000	8,1	1,1	3,0	1,0
	\approx 5000	4,8	1,7	0,1	1,2
	\approx 2500	7,9	2,2	3,2	1,1
	\approx 1200	7,9	3,1	8,4	3,4
	\approx 600	14,6	2,0	16,7	5,5
	\approx 300	3,0	5,7	7,3	7,6
20	\approx 10000	11,6	0,6	9,7	1,0
	\approx 5000	13,8	1,7	1,7	4,5
	\approx 2500	11,3	2,4	2,4	4,7
	\approx 1200	13,5	4,6	6,4	2,7
	\approx 600	4,2	4,1	2,8	4,2
	\approx 300	2,5	4,4	3,4	6,3
43	\approx 4000	0,7	2,3	12,3	1,5
	\approx 2000	0,4	1,3	5,8	3,0
	\approx 1000	3,1	3,9	6,0	2,6
	\approx 500	5,2	1,5	7,9	4,3
	\approx 250	6,6	5,0	7,7	6,2

Примечание. RSD, % — относительное стандартное отклонение.

Note. RSD, %—relative standard deviation.

Таблица 5. Результаты оценки коэффициента корреляции линейной зависимости измерений в серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами 10, 20 и 43 мкм

Table 5. The results of assessment of the linear correlation coefficient of measurements performed for a series of dilutions of reference latex particles (10, 20, and 43 μm)

Суспензия латексных частиц размером, мкм Suspension of reference latex particles, μm	Методика на основе метода Култера Coulter method		Методика на основе счетно-фотометрического метода Light obscuration method
	трубка с апертурой диаметром 100 мкм 100 μm aperture tube	трубка с апертурой диаметром 200 мкм 200 μm aperture tube	счетчик частиц HIAC 9703+ HIAC 9703+ Particle Counter
10	0,9998	0,9998	0,9998
20	0,9999	0,9981	0,9999
43	0,9950	0,9986	0,9997

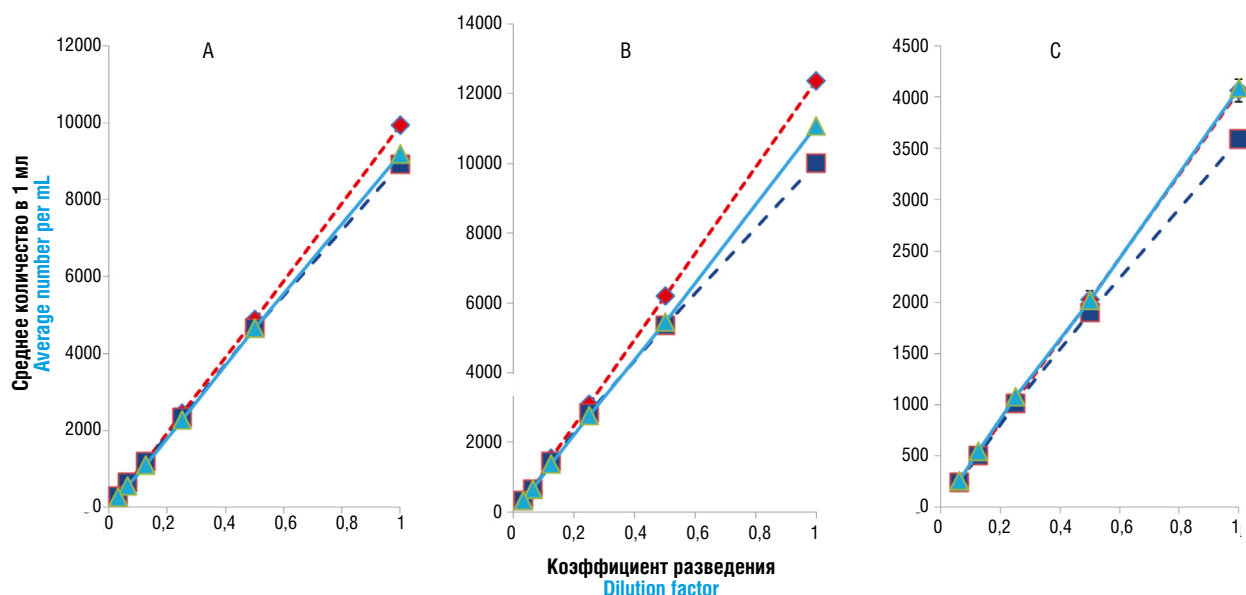


Рис. 3. Среднее количество частиц в серии разведений суспензий стандартных латексных частиц размерами: А — 10 мкм; В — 20 мкм; С — 43 мкм. —♦— апертура диаметром 100 мкм; —■— апертура диаметром 200 мкм; —▲— счетно-фотометрический метод.

Fig. 3. The average number of particles in dilutions of suspensions of reference latex particles of the following sizes: А—10 μm ; В—20 μm ; С—43 μm . —♦— 100 μm aperture; —■— 200 μm aperture; —▲— light obscuration method.

висимости, рассчитанный методом наименьших квадратов. Критерий приемлемости: коэффициент корреляции должен быть больше или равен 0,99.

Результаты, полученные с использованием стандартного образца счетной концентрации, представлены в таблице 3. Полученные значения подсчета количества частиц для методики на основе метода Култера и счетно-фотометрического метода не превышают погрешность стандартного образца счетной концентрации. Правильность модифицированной методики оценивали по стандартному образцу счетной концентрации в сравнении со счетно-фотометрическим методом. В обоих случаях правильность подтверждается, отклонение результатов не превышало 10%. Повторяемость результатов, полученных каждым методом, составила 2%.

Результаты оценки правильности и повторяемости, полученные с использованием серии разведений суспензии стандартных латексных частиц, представлены в таблице 4.

Отклонение от среднего значения (табл. 4) составило 14,6% (для апертуры 100 мкм) и 16,7% (для модифицируемой методики с использованием апертуры 200 мкм), что удовлетворяет принятым критериям приемлемости (20%). Относительное стандартное отклонение, характеризующее повторяемость результатов измерений, составило 5,7% (для апертуры 100 мкм) и 7,6% (для модифицированной методики), что так-

же удовлетворяет принятым критериям приемлемости (20%). Таким образом, подтверждена правильность и повторяемость модифицированной методики в сравнении с методикой с использованием трубки с апертурой 100 мкм и счетно-фотометрическим методом.

Относительное стандартное отклонение увеличилось в исследуемых образцах, содержащих меньшее количество частиц, но даже при минимальных значениях концентрации ≈ 200 –300 частиц в 1 мл значение *RSD* не превысило 10%. Оценка линейности и коэффициенты корреляции приведены в таблице 5 и на рисунке 3. Во всех случаях коэффициент корреляции превысил 0,99, что экспериментально доказывает линейность.

Выводы

Проведенное исследование подтвердило возможность использования модифицированной методики с апертурой диаметром 200 мкм, основанной на методе Култера.

Проведены валидационные исследования модифицированной методики. Правильность методики в сравнении со стандартным образцом счетной концентрации составила 5,3% (по отклонению от среднего значения); в сравнении со счетно-фотометрическим методом — 4,2%. Повторяемость (сходимость) результатов составила: 1% (по максимальному относительному стандартному откло-

нению) — при концентрации частиц порядка 10 тыс. в 1 мл и 7,6% — для концентрации 300 частиц в 1 мл. Показана линейность методики (коэффициент корреляции линейной зависимости более 0,99).

Применение модифицированной методики позволит оценить весь требуемый диапазон размеров невидимых механических включений при оценке качества растворов для парентерального введения по показателю «Невидимые механические включения».

Вклад авторов. **А. А. Воропаев** — идея и дизайн исследования, экспериментальная работа с набором суспензий стандартных латексных частиц, обобщение экспериментальных данных, написание текста; **О. В. Фадейкина** — концепция, уточнение дизайна исследований, экспериментальная работа со стандартным образцом счетной концентрации, анализ и интерпретация результатов, статистическая обработка результатов; **Д. С. Давыдов** — разработка дизайна исследования, консультативная помощь в анализе результатов и оценке состояния проблемы, анализ и интерпретация результатов; **А. А. Мовсесянц** — консультативная помощь в анализе результатов и окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. **Andrey A. Voropaev**—elaboration of the study idea and design, experimental work with suspensions of reference latex particles, summarising of experimental data, writing of the text; **Olga V. Fadeikina**—elaboration of the study concept, refinement of the study design, experimental work with the particle count reference standard, analysis, interpretation, and statistical processing of the results; **Dmitry S. Davydov**—elaboration of the study design, advisory assistance in the analysis of the results and assessment of the state of the problem, analysis and interpretation of the results; **Artashes A. Movsesyants**—advisory assistance in the analysis of the results, approval of the final version of the paper for publication.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич. Andrey A. Voropaev. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук. Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук. Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1768-1362>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф. Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Статья поступила 08.10.2020

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 10.06.2021

Конфликт интересов. А. А. Мовсесянц является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Artashes A. Movsesyants is member of the Editorial board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

1. Воропаев АА, Фадейкина ОВ, Ермолаева ТН, Давыдов ДС, Кудашева ЭЮ. Оценка возможности применения метода Култера (электрочувствительных зон) для определения невидимых механических включений в препаратах крови человека отечественного производства. *Антибиотики и химиотерапия*. 2017;62(7–8):32–7. [Voropaev AA, Fadeikina OV, Ermolaeva TN, Davydov DS, Kudashева EY. The assessment of the possibility to use the Coulter's method (electrosensitive zones) for identification of invisible particulate matter in human blood-derived products produced in Russia. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2017;62(7–8):32–7 (In Russ.)]
2. Barnard J, Rhyner M, Carpenter J. Critical evaluation and guidance for using the Coulter method for counting subvisible particles in protein solutions. *J Pharm Sci*. 2012;101(1):140–53. <https://doi.org/10.1002/jps.22732>
3. Новик ЕС, Доренская АВ, Борисова НА, Гунар ОВ. Особенности анализа лекарственных препаратов для парентерального применения методом электрочувствительных зон. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(2):123–7. [Novik ES, Dorenskaya AV, Borisova NA, Gunar OV. Aspects of medicines quality evaluation by electrical sensing zone method. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(2):123–7 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-123-127>
4. Narhi L, Jiang Y, Cao S, Benedek K, Shnek D. A critical review of analytical methods for subvisible and visible particles. *Curr Pharm Biotechnol*. 2009;10(4):373–81. <https://doi.org/10.2174/138920109788488905>
5. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1998. [Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1994]
6. Johnson JB. Thermal agitation of electricity in conductors. *Physical Review*. 1928;32(1):97–109. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.32.97>

Received 8 October 2020

Revised 27 May 2021

Accepted 10 June 2021